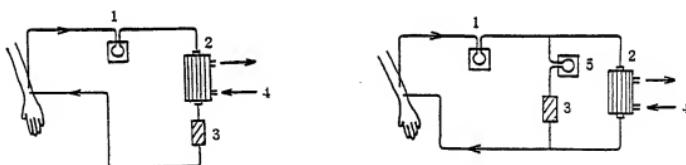




特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ⁴ A61M 1/36	A1	(11) 国際公開番号 (43) 国際公開日	WO 87/01597 1987年3月26日 (26.04.87)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP86/00485</p> <p>(22) 国際出願日 1986年9月18日(18.09.86)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願昭60-207250</p> <p>(32) 優先日 1985年9月19日(19.09.85)</p> <p>(33) 優先権主張国 JP</p> <p>(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) (JP/JP) 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 井田伸夫 (IDA, Nobuo) (JP/JP) 〒248 沼津川県御殿場市雄倉山3-20-1 Kanagawa, (JP) 片岡 浩 (KATAOKA, Hiroshi) (JP/JP) 〒248 沼津川県御殿場市雄西2-4-21 Kanagawa, (JP) 酒友 宏之輔 (KUNITOMO, Tetsunosuke) (JP/JP) 〒248 沼津川県御殿場市雄西2-2-24 Kanagawa, (JP)</p> <p>(81) 指定国 DE(欧洲特許), FR(欧洲特許), GB(欧洲特許), IT(欧洲特許), JP, SE(欧洲特許), U.S.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>			

(54) Title: β_2 -MICROGLOBULIN-REMOVING COLUMN(54) 発明の名称 β_2 -ミクログロブリン除去カラム

(57) Abstract

A β_2 -microglobulin-removing column prepared by immobilizing anti- β_2 -microglobulin antibody on an insoluble support, which enables β_2 -microglobulin in blood to be specifically adsorbed and removed. This column is useful for prophylaxis and treatment of carpal tunnel syndrome observed with patients subjected to a dialysis treatment.

(57) 要約

抗 β_2 -ミクログロブリン抗体を不溶性担体に固定化してなるカラムは、血液中の β_2 -ミクログロブリンを特異的に吸着・除去することができる。このカラムは透析患者にみられる手根管症候群などの予防・治療に有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公報される請求出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	FR フランス	ML マリー
AU オーストラリア	GA ガボン	MR モーリタニア
BB バルバドス	GB イギリス	MW マラウイ
BE ベルギー	HU ハンガリー	SL オランダ
BR ブラジル	IT イタリー	NO ノルウェー
BG ブルガリア	JP 日本	RO ルーマニア
CF 中央アフリカ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SD スーダン
CG コンゴー	KR 大韓民国	SE スウェーデン
CH スイス	LI リヒテンシュタイン	SX セネガル
CN カメルーン	LK スリランカ	SU ソビエト連邦
DE 西ドイツ	LU ルクセンブルク	TH タイ

明細書

 β_2 -ミクログロブリン除去カラム

技術分野

本発明は β_2 -ミクログロブリンの除去カラムに関するものであり、さらに詳しくは血液中から β_2 -ミクログロブリンを特異的に吸着・除去するためのカラムに関するものである。

背景技術

β_2 -ミクログロブリンは、組織適合性抗原（ヒトではHLA class I）を構成する2本鎖タンパクのうちの軽鎖であり、ほとんどすべての細胞表面上に見い出されるとともに、体液中にも重鎖と結合しない遊離の状態で見い出されるが、遊離の β_2 -ミクログロブリンの生理的機能はわかっていない。すでに、ヒトその他各種の動物で全アミノ酸配列が明らかにされ、ウシのタンパクではX線結晶解析から立体構造も決められた。その結果、分子量約12,000の糖鎖を持たない単純タンパクであり、構造的に免疫グロブリンのCDメイン（定常ドメイン）と類似性の高いことが示されている。また、動物種間でのアミノ酸配列の相同性も60～80%とかなり高い（Proc. Natl. Acad. Sci 257, 2619 (1982)など）。

腎疾患のため長期間にわたって血液透析を行なっている患者では血液中の遊離の β_2 -ミクログロブリン濃度が健常者に比べて10～100倍にも増大しており、これは健常者では腎臓で分解される β_2 -ミクログロブリ

ンが血液透析では除去されずに蓄積されるためと考えられる。

本発明者らは、透析患者に高率で発病する手根管症候群の患者から患部に沈着しているアミロイドタンパクを検出・分析し、その大部分は β_2 -ミクログロブリンであることを見い出した。従って、手根管症候群の原因は、人工透析によって血中に高濃度で蓄積された β_2 -ミクログロブリンが患部に沈着するためであることが推定され、人工透析と併行して血液中の β_2 -ミクログロブリンを除去することにより、手根管症候群の発病を抑制し得ることが期待される。また、手根管部以外の部位のアミロイド沈着にも β_2 -ミクログロブリンが関係している可能性がある。

これまで、高濃度の血中 β_2 -ミクログロブリンが原因と考えられる病気は知られていないかったために、その除去についての検討は全くなされていなかった。

発明の開示

本発明の目的は、血液中の β_2 -ミクログロブリンを選択的に除去する方法を提供することにある。

上記目的は、以下の本発明により達成される。すなわち、本発明は固定化抗 β_2 -ミクログロブリン抗体を用いた β_2 -ミクログロブリンの吸着・除去カラムを提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、血液透析器と β_2 -ミクログロブリン除去

カラムを併用するための回路の例を示すものであり、(a)は直列に接続した場合、(b)は並列に接続した場合を各々示す。

第2図は、実施例1におけるカラムフラクションを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果の模式図である。

第3図は、実施例2におけるカラムフラクションの全タンパク量および β_2 -ミクログロブリンの濃度を示す。

第4図は、実施例4における血液中の残存 β_2 -ミクログロブリン量の経時変化を示すものであり、(a)は抗 β_2 -ミクログロブリン抗体を固定化したカラムを使用した例を、(b)は(a)のカラムを再使用した例を、(c)は抗 β_2 -ミクログロブリン抗体を固定化していないカラムを使用した例を各々示す。

15 発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる抗 β_2 -ミクログロブリン抗体は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどの動物を免疫して得られる多クローナル性抗体、および細胞融合技術などを利用して得られる单クローナル性抗体のいずれもが利用できる。免疫する β_2 -ミクログロブリンは、得られた抗体がヒトの β_2 -ミクログロブリンと結合し得るならば動物種を問わないが、結合の効率を上げるためにヒト、サル由来のものが好ましく、ヒト由来のものがさらに好ましい。また、同等の免疫原性を有するそのペプチド断片や合成ペプチドも同様に用いることができる。

なお、効率よく β_2 -ミクログロブリンを除去し血球の機能などに影響を与えないためには、細胞表面のHLAを構成している β_2 -ミクログロブリンとは反応せず、遊離の β_2 -ミクログロブリンとのみ結合するような单クローニング抗体を用いることがより好ましい結果を与える。

本発明で用いられる不溶性担体としては、アガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、およびポリスチレン誘導体などの各種天然、合成ポリマーが挙げられるが、材質としては血液成分の非特異吸着がないような親水性のものが好ましい。使用時の形状は、ビーズ状、纖維状、フィルム状などいずれでも可能である。ビーズ状で用いる場合には、このビーズを充填したカラムの中を β_2 -ミクログロブリン含有溶液が循環できるならば粒子径は問わないが、流路抵抗を減らすためには直径 50~3,000 μm のものが好ましく、200~3,000 μm のものがさらに好ましい。また、ビーズは物理的に強固で圧力による変形が小さいものが望ましい。

抗体の不溶性担体への結合は、臭化シアン、カルボジイミドなどのカップリング剤を用いる方法、グルタルアルデヒドなどの架橋剤を用いる方法などにより、化学的に共有結合させればよい。また、あらかじめ不溶性担体に固定化したプロテイン A を介して抗ヒト β_2 -ミクログロブリン抗体を結合させ、抗体量あたりの抗原吸着能

を高めることも可能である。ただしこの場合には、抗体の離脱を防ぐためプロテインAと抗体の間を化学的に架橋しておく必要がある。

抗体の結合量およびカラムの大きさは特に限定されないが、治療結果を高くするためにはカラム1本あたり50mg以上の β_2 -ミクログロブリンを吸着し得ることが望ましい。抗体1gあたりの抗原 β_2 -ミクログロブリンの吸着量は50mg～150mg程度であるから、カラム1本あたり300mg以上の抗体結合量が必要である。ただし、1回の治療で2本以上のカラムを用いるならば、カラムあたりの抗体量を減らすことは可能になる。

このようにして得られた抗体固定化不溶性担体を適当なカラムに充填し、これに血液を流すことにより血液中の β_2 -ミクログロブリンを極めて選択的に効率よく吸着・除去することができる。

治療に際しては、 β_2 -ミクログロブリン除去カラムは単独で用いてもよいが、主な対象患者が人工透析患者であることから考えて、血液透析器と直列または並列に接続して同時に血液循環を行なう方法が操作の簡便さから見て望ましい。

本発明のカラムと血液透析器を連結した例を第1図をもって説明する。直列に接続する時の1例を第1図(a)に示すが、患者より体外に取り出された血液は、血液ポンプ1を通じて血液透析器2に入り、透析液4により通常の透析処理を受けた後、さらに β_2 -ミクログロブリ

ン除去カラム3内で β_2 -ミクログロブリンが除去されて体内にもどされる。第1図(a)では β_2 -ミクログロブリン除去カラム3を血液透析器2の後に接続した例を示したが、血液透析器2の前、すなわち血液ポンプ1の前後のいずれの位置に接続しても良い。また、並列に接続する時の1例を第1図(b)を用いて説明する。患者より体外に取り出された血液は、血液ポンプ1を通った後、二方向に分離される。一方は、血液透析器2に入り、透析液4により通常の透析処理を受け、また他方は補助ポンプ5で流量を調整した後、 β_2 -ミクログロブリン除去カラム3内で除去行ない、血液透析器2から出てきた血液と合わされ体内にもどされる。並列に接続する場合も、 β_2 -ミクログロブリン除去カラム3は、回路中のいかなる場所に接続しても良い。並列の場合、バイパスの血流量を一定にするために第1図(b)のように、補助ポンプ5を用いても良いが、補助ポンプ5は用いずに回路の内径で調整することも可能である。本発明のカラムと連結する血液透析器の透析膜の素材は、セルロース、酢酸セルロース、ポリメチルメタクリレート、ポリアクリロニトリル、ポリスルホン、ポリアミド、ポリエステル、ポリビニルアルコール、ビニルアルコール共重合体など特に限定されないが、 β_2 -ミクログロブリンの除去量をより高めるためには、分子量10,000のタンパクの透過率が2%以上の透析膜が望ましい。

また、本発明の β_2 -ミクログロブリン除去カラムに

は、全血を流しても良いが、操作は煩雑になるが、全血を循環させるかわりに通常用いられる血漿分離装置により、血球成分を除いた血漿を流しても同様の効果を得ることができる。

5 さらに吸着に用いたカラムは、pH 2 前後の酸性溶液を流すことにより再生、再使用が可能である。

本発明のカラムは、 β_2 -ミクログロブリンを選択的に吸着するため、簡便にかつ効率良く血液中の β_2 -ミクログロブリンを除去することができる。さらに本発明
10 のカラムは、吸着された β_2 -ミクログロブリンを溶出液で溶出することにより、くり返し再使用できるという利点もある。

以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。

15 実施例 1

N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基を、10原子の長さのスペーサー ($-OCH_2CONH(CH_2)_3NHCO(CH_2)_2-$) を介して導入したアガロースゲル (“アフィigel 10”、Bio Rad 社製) 1mLに、市販の抗ヒト β_2 -ミクログロブリンモノクローナル抗体 (Oiac社製 “MCA06”) 1.46mgを0.1MHE
20 PES-NaOH緩衝液 (pH 7.5) 1mLに溶解した溶液を加え、4℃で一夜ゆっくりと攪拌した。

1Mエタノールアミン-塩酸 (pH 8.0) 0.1mL
25 を加えて室温で1.5時間反応させ、未反応のN-ヒド

ロキシスクシンイミドエステル基をブロックした後、それぞれ0.5MのNaClを含む0.1M酢酸-NaOH(pH4.0)1mLおよび0.1M炭酸-NaOH(pH9.0)1mLで交互に3回洗浄し、最後にPBSにて平衡化を行なった。固定化後の溶液に残存しているタンパク量は0.02mgであり、1gのゲルに対して1.44mgの抗体が固定されたことになる。

10 このようにして得た抗体固定化ゲル0.3mLを市販の小型カラム($\phi = 8\text{ mm}$)に充填し、これに0.1mg/mLのウシ血清アルブミン(BSA)および0.1mg/mLのヒト β_2 -ミクログロブリンを、PBSに溶解したモデル溶液を室温下2.4mL/hの流速で流した。流し始めから0.63mLずつをフラクションコレクターで分取し、各フラクション(2~5)の20μLをSDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析した。

結果を第2図に示す。第2図は電気泳動で分析した結果の模式図である。Lane1はカラムを通す前にモデルタンパク溶液を泳動した結果であり、Lane2~5はそれぞれカラムフラクション2~5の泳動結果である。

20 矢印は β_2 -ミクログロブリン($\beta_2\text{ m}$)およびBSAの標準サンプルの泳動位置を示す。

分析を行なったフラクション2~5すべてにおいて、 β_2 -ミクログロブリンのBSAに対する量比は、カラムにかける前の溶液よりも小さく、 β_2 -ミクログロブリンのみが選択的にカラムに吸着されることが示された。

さらに、カラム内に残ったタンパクを PBS で洗い流した後、50 mM グリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.4) を用いて抗体に結合していた抗原を溶出させたところ、 β_2 -ミクログロブリンのみが溶出してきた。溶出液 20 μl を電気泳動した結果を第2図の lane 6 に示す。

実施例 2

実施例 1 と同様にした調製したカラムに高レベルで β_2 -ミクログロブリンを含む人工透析患者の血清を流し、流し始めから 0.32 mLずつをフラクションコレクターを用いて分取した。

各フラクションの全タクパク量 (280 nm の吸光度で表示)、および免疫学的測定法により定量した β_2 -ミクログロブリン ($\beta_2 \text{m}$) の濃度を第3図に示す。10 番までのフラクションでは、全タンパク量に対する β_2 -ミクログロブリンの量比は、カラムに流す前の血清と比べて有意に低く、抗体により吸着除去されたことを示している。(カラムに流す前の血清では、280 nm の吸光度は 72.1、 β_2 -ミクログロブリン濃度は 40.5 mg/mL であった。)

20 第3図の結果から、カラムに吸着された β_2 -ミクログロブリンの総量は 0.049 mg であり、固定化抗体 1 mg に対して 0.11 mg の β_2 -ミクログロブリンが吸着されたことになる。

実施例 3

25 9 原子の長さのスペーサー (-OCH₂CH(OH))

CH₂ NH (CH₂)₄-) を介してホルミル基を導入したセルロースビーズ（“ホルミル・セルロファイン”チッソ社製）2.8mLと、実施例1および2で用いた市販抗・ヒトβ₂-ミクログロブリンモノクローナル抗体 5 2mgを、6mLのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中で混合し、4°C 2時間反応後ジメチルアミンボランで還元しつつ、さらに1夜反応させることにより、担体1mLあたり0.54mgの抗体が固定化されたビーズを調製した。未反応のホルミル基はTrisのアミノ基と反応させプロックした。

このビーズ2.1mL(抗体量として1.1mg)を小型のカラムに充填し、β₂-ミクログロブリンを添加した健常者血液10mLを、1mL/minの流速で2時間循環させた。適当な時間に少量の血液を分取し、血中のβ₂-ミクログロブリン(β₂m)量を測定した結果を第4図 15 (a)に示す。循環開始後10分以内に吸着は完了し、吸着量は用いた抗体量の約1/10にあたる100μgであった。

このカラムを1Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH 2.8) 20 で洗浄した後、もう1度同じ循環実験を行なったところ、第4図(b)に示すように1回目と同等以上の吸着が見られ、カラムの再生が可能であった。抗体を固定化していないセルロースビーズ抗体のみを用いたコントロール実験(第4図(c))では吸着はほとんど見られなかっ 25 た。

11

産業上の利用可能性

以上のように、本発明のカラムは血液中の β_2 -ミクログロブリンを特異的に吸着・除去することができるため、透析患者にみられる手根管症候群などのアミロイドーシスや骨障害などの合併症の予防・治療に極めて有用である。

10

15

20

25

12

請 求 の 範 囲

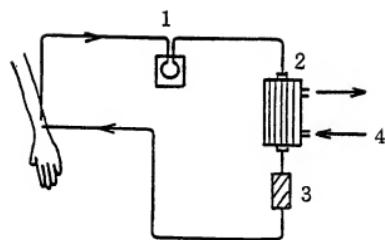
1. 抗 β_2 -ミクログロブリン抗体を不溶性担体に固定化してなる β_2 -ミクログロブリン除去カラム。
2. 抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1項記載のカラム。
3. 血液透析器と、抗 β_2 -ミクログロブリン抗体を不溶性担体に固定化してなる β_2 -ミクログロブリン除去カラムとを直列または並列に連結してなる血液透析システム。

10

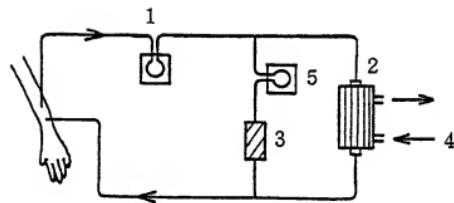
15

20

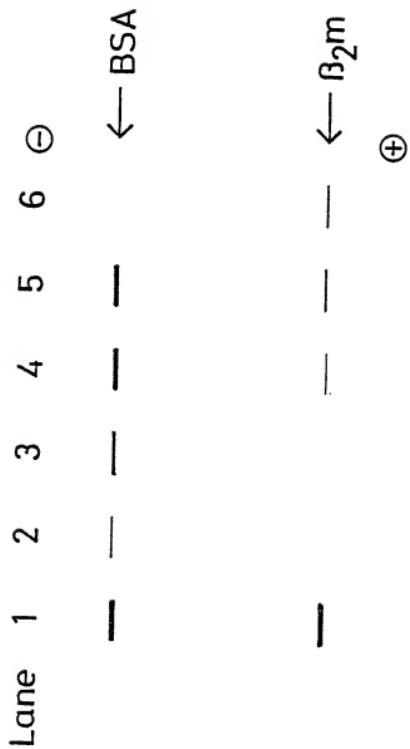
25



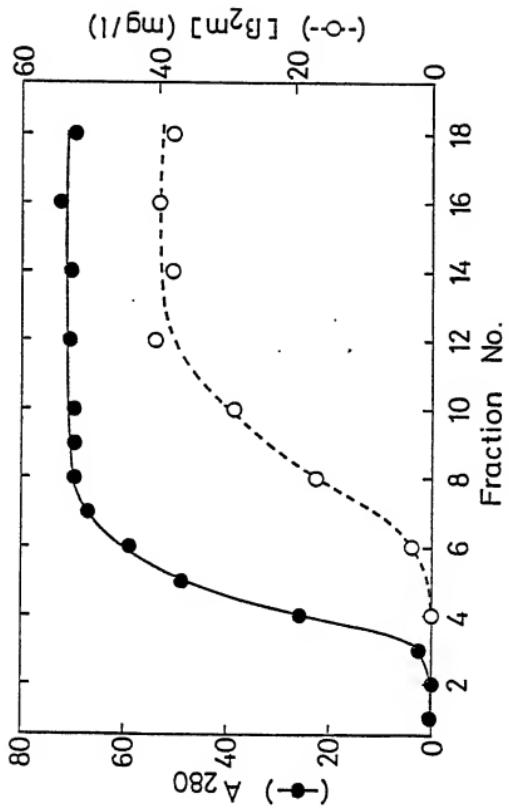
(a)



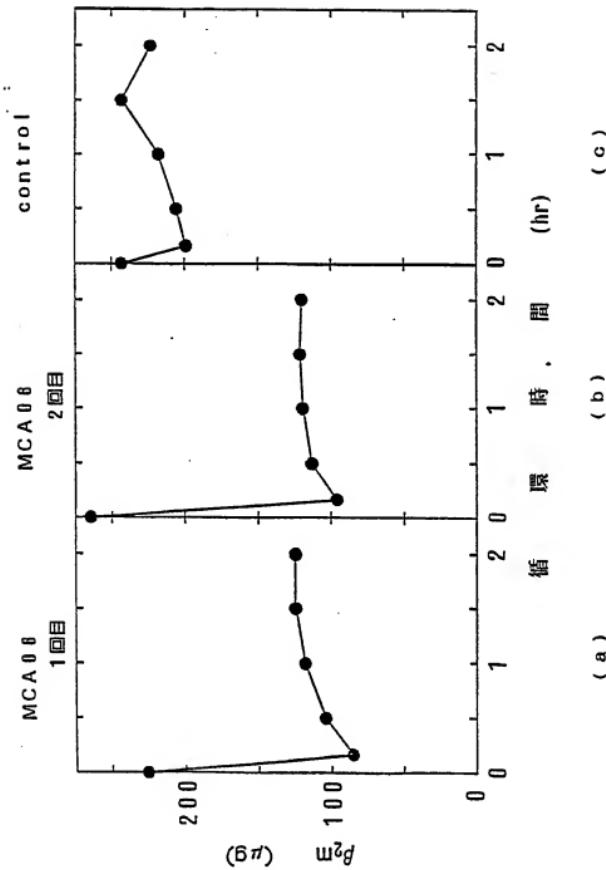
(b)



第 2 図



第 3 図



第 4 図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP86/00485

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all)¹

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl⁴ A61M1/36

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched⁴

Classification System	Classification Symbols
IPC	A61M1/36, A61M1/00 G01N33/54, C07K3/12

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched⁴

Jitsuyo Shinan Koho 1966 - 1986
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1986

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT¹⁴

Category ⁵	Citation of Document, ¹⁴ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁴	Relevant to Claim No. ¹⁴
X	JP, A, 55-30652 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd.) 4 March 1980 (04. 03. 80) & SE, A, 7907118 & DE, A1, 2934756 & FR, A1, 2435039 & GB, A, 2030294 & GB, B2, 2030294 & FR, B1, 2435039 & CH, A, 645727 & DE, C2, 2934756	1-3
X	JP, A, 54-037821 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd.) 20 March 1979 (20. 03. 79) (Family: none)	1-3
X	JP, A, 56-93046 (Fuji Zoki Seiyaku Kabushiki Kaisha) 28 July 1981 (28. 07. 81) (Family: none)	1-3

¹⁴ Special categories of cited documents:¹⁴

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search²

December 8, 1986 (08. 12. 86)

Date of Mailing of this International Search Report²

December 22, 1986 (22. 12. 86)

International Searching Authority¹

Japanese Patent Office

Signature of Authorized Officer¹²

I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類 (IPC) Int. Cl.

A61M1/36

II. 国際調査を行った分野

調査を行った最小限資料	
分類体系	分類記号
IPC	A61M1/36, A61M1/00 G01N33/54, C07K3/12

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

日本国実用新案公報 1966-1986年

日本国公開実用新案公報 1971-1986年

III. 関連する技術に関する文献

引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
X	JP,A,55-30652(生化学工業株式会社) 4.3月.1980(04.03.80) &SE,A,7907118&DE,A1,2934756 &FR,A1,2435039&GB,A,2036294 &GB,B2,2030294&FR,B1,2435639 &CH,A,645727&DE,C2,2934756	1-3
X	JP,A,54-037821(生化学工業株式会社) 20.3月.1979(20.03.79)(ファミリーなし)	1-3
X	JP,A,56-93046(富士謹器製薬株式会社) 28.7月.1981(28.07.81)(ファミリーなし)	1-3

※引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の
 日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出
 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解
 のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新
 規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の
 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進
 歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリーの文献

IV. 認証

国際調査を完了した日

08.12.86

国際調査報告の発送日

22.12.86

国際調査機関

日本国特許庁 (ISA/JP)

権限のある職員

特許庁審査官 津野

4C 7720

三
三
三
三
三